View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk

brought to you by CORE

provided by Theseus

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Biotekniikka

2009

Miia Juuruskorpi

VIILIHAPATTEIDEN OMINAISUUKSIEN JA EKSOPOLYSAKKARIDIEN TUOTON KARAKTERISOINTI

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

OPINNÄYTETYÖ (AMK) | TIIVISTELMÄ

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU

Bio- ja elintarviketekniikka | Biotekniikka

14.12.2009 | Sivumäärä 24

Ohjaajat: FT Vesa Joutsjoki, FT Minna Kahala, FT Ilari Suominen

Tekijä Miia Juuruskorpi

VIILIHAPATTEIDEN OMINAISUUKSIEN JA EKSOPOLYSAKKARIDIEN TUOTON KARAKTERISOINTI

Työn tarkoituksena oli tutkia viilihapatteiden ominaisuuksia ja saada koostettua mahdollisimman kestävä ja haluttuja ominaisuuksia tuottava hapate teollisuuskäyttöön. Viilin valmistuksessa käytettävä hapate sisältää maitohappobakteereja, jotka vaikuttavat tuotteen rakenne- ja aromiominaisuuksiin. Viilin venyvästä rakenteesta vastaavat laktokokit, jotka pystyvät muodostamaan solun ulkopuolelle erittyviä limamaisia polysakkarideja.

Eksopolysakkaridien tuotto on mikrobisolussa plasmidisidonnaista ja sitä ohjaa useasta geenistä koostuva eps-klusteri. Työssä tutkittiin eps-klusterin sisältävän plasmidin esiintymistä hapateseoksiin valituilla kannoilla.

eps-klusterin sisältävät kannat tunnistettiin DNA-hybridisaatiossa. Koettimena käytettiin leimattua *Lactococcus lactis* –kannan *epsB* ja *epsD* geenien alueista PCR:lla monistettua, geeniä vastaava tuotetta. Geenien ekspressiota tutkittiin myös RNA-hybridisaatiossa, saamatta tästä tulosta.

Yksittäiset maitohappobakteerikannat käyttäytyvät hapateseoksissa eri tavalla saaden aikaan viilimäisen rakenteen. Seosten saostamis- ja venyvyysominaisuuksia tutkittiin pH- ja viskositeettimäärityksillä. Maitokasvatuksissa havaittiin eroja työssä tutkittujen seosten välillä, mutta vahvistaen myös viilihapatteiden tietynlaista käyttäytymistä.

Taustana oli hankkeen aikaisemmin saadut tulokset, joissa viilihapatteista eristetyt kannat on tunnistettu erilaisin feno- ja genotyyppisin menetelmin. Näiden tulosten pohjalta on koostettu uusia hapateseoksia viilin valmistukseen maidon saostusominaisuuksiin ja genotyyppiin perustuen.

ASIASANAT:

Viili, hapate, maitohappobakteerit, eksopolysakkaridit

BACHELOR OF ENGINEERING THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Biotechnology and Food Technology | Biotechnology

14 Dec. 2009 | Total number of pages 24

Instructors Vesa Joutsjoki, Ph.D., Minna Kahala, Ph.D., Ilari Suominen, Ph.D.

Author Miia Juuruskorpi

PROPERTIES OF VIILI STARTERS AND CHARACTERIZATION OF EXOPOLYSACCHARIDE PRODUCTION BY LACTIC ACID BACTERIA

The starter which is used in the making of the fermented milk product viili contains lactic acid bacteria which affect the texture and aroma properties of the product. The lactococci which are able to form secreted polysaccharides outside the cell are responsible for the ropy structure of viili. The purpose of this thesis was to study the properties of fermented milk starters and to formulate a stable and with the desired properties for industrial use.

The production of exopolysaccharides is plasmid-bound in the microbial cell and is controlled by an eps cluster. The occurrence of the plasmid containing the eps cluster was studied in the selected lactic acid bacteria.

Isolates containing the eps cluster were identified by DNA hybridisation. The *Lactococcus lactis* strain was used as a template in PCR as *epsB* and *epsD* fragments were labeled for use as a probe. The gene expression was also studied by RNA hybridisation but no results were obtained.

Single isolated lactic acid bacteria behave in a different way in the starters achieving a thick, ropy texture and a pleasant sharp taste. The precipitation and ropy properties of the starters were studied by pH and viscosity determinations in the milk culture. Differences were noticed between the strains but a certain kind behaviour of viili was confirmed.

This study was part of a bigger project were strains have been isolated from viili starters and identified by phenotypic and genotypic methods. Based on these results, new viili starter mixtures based on strains producing good precipitation results have been formulated for industrial use.

KEYWORDS:

Viili, starter, lactic acid bacteria, exopolysaccharides

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO **1**
2 HAPATETUT MAITOTUOTTEET **2**
2.1 Viili 3
2.2 Hapatteet 3
3 EKSOPOLYSAKKARIDIT **5**
3.1 Eksopolysakkaridit teollisuuden käytössä 5
3.2 Eksopolysakkaridien tuottamat ominaisuudet 6
3.3 Eksopolysakkaridien vaikutukset 7
4 KÄYTETYT MENETELMÄT JA KANNAT **7**
4.1 Eksopolysakkaridien tuoton tutkiminen 8
4.1.1 PCR 8
4.1.2 Totaali-DNA-eristys 11
4.1.3 Totaali-RNA-eristys 12
4.1.4 Hybridisaatio 14
4.1.5 RNA-näytteiden hybridisaatio 14
4.2 Pulssikenttäelektroforeesi 15
4.3 Maitokasvatukset 17
5 TULOKSET **17**
5.1 eps-tuotto 17
5.2 Pulssikenttäelektroforeesi 18
5.3 Maitokasvatukset 19
5.3.1 Kuuden viikon maitokasvatukset 19
5.3.2 Kahden viikon maitokasvatukset 21
6 YHTEENVETO **22**
LÄHTEET **24**

KUVAT

Kuva 1. DNA-hybridisaatio epsB –koettimella. 18
Kuva 2. DNA-hybridisaatio epsD –koettimella. 18
Kuva 3. Hapatekantojen DNA-profiilit. 19

KUVIOT

Kuvio 1. Viskositeettimittaukset. 20
Kuvio 2. pH mittaukset. 21
Kuvio 3. Viskositeettimittaukset, maitokasvatus 2. 22

Kuvio 4. pH mittaukset, maitokasvatus 2. 22

TAULUKOT

Taulukko 1. Hapatteiden laatuominaisuudet, niihin vaikuttavat tekijät ja perusteet hapatebakteerikantojen valinnalle. [4] 4
Taulukko 2. PCR-reaktiossa käytetyt alukkeet. 8
Taulukko 3. DNA-eristysten absorbanssimittaukset. 12
Taulukko 4. RNA-eristysten absorbanssimittaukset. 13

LIITTEET

Kasvatusalustat
Hybridisaatioliuokset ja –reagenssit
PFGE-kokeiden reagenssit
Maitokasvatukset

1 Johdanto

Viilihapatteiden ominaisuuksien, sen sisältämien maitohappobakteerien tyypitys ja karakterisointi on teollisuusosapuolen tarpeesta alkanut hanke kehittää halutunlaiset hapatteet tietynlaisiin viilituotteisiin. Tavoitteena on saada koostettua mahdollisimman hyvin kestävä, karakterisoitu viilihapate. Tuntemalla hapatteeseen käytettyjen maitohappobakteerien ominaisuudet ja tyypit, saadaan hallitusti kehitettyä hapate, joka vastaa haluttuja ominaisuuksia. Hapateseosten optimointi on vaikeaa, koska yksittäiset kannat eivät käyttäydy samoin kuin seoksissa.

Aikaisemmissa töissä on eristetty kolmesta teollisuudessa käytössä olleista, koostumukseltaan tuntemattomista viilihapatteista maitohappobakteerikannat, tunnistettu niitä erilaisin geno- ja fenotyyppisin menetelmin, testattu hapateprosessien bakteriofageja ja eristetyistä kannoista on maitokasvatuksilla testattu niiden tuottamia ominaisuuksia saostavuuteen ja venyvyyteen. Tässä työssä tarkoituksena oli tutkia kantojen yhteisvaikutusta erilaisissa hapateseoksissa ja hybridisaatiolla tunnistaa kannat, jotka tuottavat eksopolysakkarideja, sekä lisäksi tyypittää pulssikenttäelektroforeesilla seoksiin käytettyjä haponmuodostajakantoja.

Kirjallisuuden perusteella valittiin hybridisaatioon käytettävät alukkeet ja testattiin menetelmän toimivuus. Tarkempaa tutkimusta tehtiin tietyllä määrällä DNA:ta ja RNA:ta, jotta saatiin vertailukelpoiset tulokset hapatekantojen välille.

Maitokasvatuksissa tutkittin neljän eri hapateseoksen ominaisuuksia kahden kasvatusjakson ajan ja tarkasteltiin hapatteiden ominaisuuksien säilymistä. Myös kylmän lämpötilan vaikutusta hapatteisiin testattiin eripituisilla jaksoilla.

Edellisissä töissä pulssikenttäelektroforeesikokeilla saatuja tuloksia täydennettiin tunnistamalla hapateseoksista eristettyjen maitohappobakteerikantojen genotyyppejä. Menetelmä oli todettu luotettavaksi ja tarkaksi erottamaan kantojen välisiä eroja.

2 Hapatetut maitotuotteet

Maitotuotteiden hapatus tai fermentointi perustuu hapatemikrobien käyttöön. Eniten käytetään maitohappobakteereja, joiden tehtävänä on tuottaa maitohappoa laktoosista ja antaa tuotteelle hapan maku ja ominainen rakenne. Suurimmassa osassa hapanmaitotuotteissa merkitystä on makua antavilla bakteereilla, lukuun ottamatta viiliä ja juustoa, joilla rakenne on olennainen osa tuotetta. Viilissä makua tuo lisäksi *Geotrichum candidum* –home, hiivalla taas on vaikutusta kefiirin ja kumissin valmistuksessa. [1]

Hapattamisprosessissa maitohappobakteerit lisääntyvät ja käyttävät osan maitosokerista, jolloin tuote hapattuu ja siihen muodostuu raikas, hapan maku. Jokaisella hapanmaitotuotteella on erilaisesti koostettu hapate ja valmistusolosuhteet, joilla saadaan muokattua lopputuotteen koostumusta ja makua. Hapatusprosessista johtuen, tuotteilla on tavallista maitoa pitempi säilyvyysaika. [2]

Hapanmaitotuotteiden maku johtuu hapatekantojen metaboliasta. Suurimpina tekijöinä on kyky tuottaa maitohappoa, asetaldehydia ja diasetyylia. Näiden suhde riippuu hapatteeseen käytetyistä kannoista. Esimerkiksi jogurtissa asetaldehydin tuotto on suuremmassa roolissa ja siihen vaikuttaa lisäksi pohjana käytetty maito, rasvapitoisuus sekä lämpökäsittelyn vaikutus käytettyyn hapatteeseen. Varastoinnin yhteydessä asetaldehydin pitoisuus saattaa alentua, varsinkin alhaisen rasvapitoisuuden sisältävistä tuotteista. Diasetyylia muodostavat vain *L. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* tai *Leuconostoc* –kantoja sisältävät hapatteet. Näillä on tärkeä merkitys esimerkiksi viilin valmistuksessa. Myös etanolia syntyy maitohappobakteereista, mutta pitoisuus on pieni, eikä sillä ole suurta merkitystä makuun, lukuun ottamatta tuotteita, joissa hiivaa käytetään tuottamaan etanolia. [1]

Hapatettujen maitotuotteiden terveyttä edistävät vaikutukset lisäävät kiinnostusta hapatekantojen tutkimiseen ja kehittämiseen. Proteiineja hajottava fermentointi on myös paremmin siedettävissä, koska tuotteet sisältävät laktoosia huomattavasti vähemmän kuin maidossa.[1]

Fermentointiprosessi vaikuttaa maidon ravintoaineisiin, joiden pitoisuuksiin voidaan vaikuttaa valitsemalla sopiva pohja tuotteelle. Käyttämällä kevyt- tai täysmaitoa, pystytään vaikuttamaan lopputuotteen rasvapitoisuuteen ja rasvaliukoisiin vitamiineihin, maitojauheella taas saadaan muokattua proteiinipitoisuutta. Maidon lämpökäsittelyllä

on myös vaikutusta; kuumennusta kestämättömät vitamiinit häviävät ja tuotantopoikkeamat johtavat erilaisiin variaatioihin B-ryhmän vitamiineissa. [1]

2.1 Viili

Viili on yksi esimerkki erityisesti pohjoismaissa valmistetusta hapatetusta maitotuotteesta, jolla rakenne on sekä tuhti, mutta helposti lusikalla leikkautuva. Viili syntyy lisäämällä hapatetta pastöroituun maitoon. Hapate sisältää haponmuodostajat *Lactococcus lactis* ssp. *lactis ja L. lactis* ssp. *cremoris* sekä *L. lactis* ssp. *diacetylactis*, jonka pääasiallinen tehtävä on tuottaa aromia, sekä arominmuodostajakanta *Leuconostoc mesenteroides*. Viilin valmistukseen käytetään myös *Geotrichum candidum* -hometta, jolla ei ole hapatusprosessissa merkitystä. Home muodostaa maidon pinnalle kerroksen, joka suojaa tuotetta hapettumiselta ja estää heroittumista. Haponmuodostajat sisältävät kapselia muodostavia kantoja, jotka tuovat viilille viskoosin ja venyvän rakenteen.[1]

Viilille ominaista on mieto, hapan maku ja venyvä rakenne, joka johtuu maitohappobakteerien ominaisuudesta muodostaa valkuaisesta limakerrostuma bakteerisolujensa ympärille.[2] Fermentaatio tuottaa viilille happaman maun, kun taas eksopolysakkaridien tuotto tuo ominaisen rakenteen.[3]

Hapanmaitotuotteet valmistetaan useimmiten homogenoituun maitoon, mutta viili on tässä suhteessa poikkeus, kun halutaan kerman nousevan tuotteen pinnalle herkulliseksi kerrokseksi. Viili hapatetaan pakkauksessaan, joten erillistä jälkikäsittelyä tai pakkausta ei enää tarvita. [2]

2.2 Hapatteet

Hapate koostetaan vaatimusten ja haluttujen ominaisuuksien pohjalta. Jokaisen tuotteen tavoitteet määritellään erikseen ja asetetaan täsmälliset vaatimukset ja laatuominaisuudet valmistettavalle tuotteelle. Tärkeimmät laatuominaisuudet ja niihin vaikuttavat tekijät näkyvät talukosta 1. [4]

Taulukko 1. Hapatteiden laatuominaisuudet, niihin vaikuttavat tekijät ja perusteet hapatebakteerikantojen valinnalle. [4]

Laatuominaisuudet	**Laadun ominaisuuksiin vaikuttavat tekijät**	**Perusteita hapatebakteerikantojen valinnalle**
Aktiivisuus	Hapatemikrobilajit ja –kannat	Maitohapon tuotto
Aktiivisuuden säilyvyys	Kasvualustan koostumus	Proteaasiaktiivisuus
Rakenteen muodostuskyky	Kasvualustan lämpökäsittely	Hapatteen muiden kantojen kasvun esto/edistäminen
Kaasunmuodostuskyky	Hapatteen ikä	Aromiaineiden tuotto
Arominmuodostuskyky	Siirrostustiheys	Liman/kapselinmuodostus, saostuneen maidon rakenne ja heroittuvuus
Elävien mikrobien määrä	Siirrostusmäärä	Suolan sieto
Eri mikrobien määrän suhde	Kasvatuslämpötila ja –aika	Korkeiden lämpötilojen sieto
Eri mikrobien aktiivisuuden suhde	Jäähdytysnopeus ja –lämpötila	Lysogenia
Maku ja haju	Hapatteen säilytysolot	Faagiherkkyys
Vieraiden mikrobien määrä	Hygieenisyys kaikissa valmistusvaiheissa	Bakteriosiinien tuotto
		Sopivuus tuotteen valmistukseen
		Sopivuus hapatetuotantoon

Hapatejärjestelmä on perustunut emähapatteisiin ja käyttöhapatteisiin. Emähapatteesta valmistetaan hapatteet käyttöön haluttujen vaatimusten mukaisesti. Hapatteita voidaan jatkaa ja siirrostaa useita kertoja. Kasvatuksissa siirrostukset tehdään kasvatuslämpöiseen maitoon tai säilytykseen menevä hapate kylmään maitoon. Olosuhteilla pystytään vaikuttamaan hapatteiden tasalaatuisuuteen ja ominaisuuksien säilymiseen. [4]

Hapatteen kasvun ollessa aktiivisimmillaan, se joko käytetään lämpöisenä tai jäähdytetään nopeasti + 4-5 °C säilytykseen. Jäähdytyksen hallinnalla pyritään säilyttämään hapatteen aktiivisuus, arominmuodostuskyky ja hapatebakteerikantojen suhteet. Hapatteesta riippuen, säilyvyysaika voi vaihdella tunneista muutamaan vuorokauteen ja joissakin tapauksissa säilytys voi jopa parantaa hapatteen

ominaisuuksia. Pakastamalla hapatteet säilyvät useita kuukausia. [4] Maitohappobakteerien lämmönkestävyydessä on eroja, jotka pitää ottaa huomioon, jos valmistusprosessi vaatii korkean lämpötilan, sillä niiden aktiivisuus heikkenee voimakkaasti lämpötilan ylittäessä 38-39 °C. [5]

Hapatteita kehittämällä päästään lopputulokseen, jossa saadaan eroteltua haluttuja ominaisuuksia hapatteille. Valikoimalla sopivat, tunnetut kannat valmistusprosessiin, saadaan hallitusti tarkempi ja tasalaatuisemmin koostettu hapate ja lopputuote. Perusteita hapatebakteerikantojen valinnoille on lueteltu taulukossa 1. [4]

Maitohappobakteerien viljelyssä on otettava huomioon haponmuodostaja- ja arominmuodostajabakteerien erilainen kasvuaika; haponmuodostajat lisääntyvät nopeasti ja ovat kokonaismäärältään ja aktiivisuudeltaan maksimitasolla 16-20 tunnin kasvatuksen jälkeen, kun arominmuodostajat taas lisääntyvät aluksi hitaasti. Sekahapatteita viljeltäessä pitää kasvua pitkittää sen verran, että se kypsyy ja saavuttaa bakteerikantojen välillä halutun suhteen. Myös kasvatuslämpötilaa tai siirrostusmäärää muokkaamalla saadaan vaikutettua haluttujen bakteerikantojen kasvuun. [5]

3 Eksopolysakkaridit

3.1 Eksopolysakkaridit teollisuuden käytössä

Polysakkaridit ovat ruokateollisuudelle merkittäviä ainesosia. Ne tuottavat ruoalle rakenteen ja vaikuttavat sen reologiseen käyttäytymiseen. Polysakkarideilla saadaan aikaan tuhtiutta, geelimäisyyttä ja stabiilia rakennetta. Esimerkikkinä näistä jäätelö, hillot, kastikkeet, leivontatäytteet, juustot ja tölkki- ja kuivaruoat. Polysakkaridit edistävät tuotteiden rakenteiden pysyvyyttä, kuten estämällä kristalloitumista tai nestemäiseksi muuttumista.[3]

Useita eksopolysakkaridin tuottajia käytetään teollisuudessa, koska ne ovat fysikaalis-kemiallisilta ominaisuuksiltaan samankaltaisia kasvi- ja merileväpolysakkaridien kanssa, joista esimerkkeinä pektiini, tärkkelykset ja karrageeni. [6]

Eksopolysakkaridien (eps) tuotto ja tuottoon käytettävä aika ovat tärkeimmät tekijät, jotka vaikuttavat lopputuotteen rakenteeseen, viskositeettiin ja tuntumaan suussa. Näiden takia maitohappobakteerien ominaisuus tuottaa eksopolysakkarideja on yksi tärkeimmistä maitoteollisuuden osista. Tuotto on riippuvainen käytetyn mediumin koostumuksesta ja viljelyolosuhteista, kuten pH, lämpötila ja happi sekä maitohappobakteerikannasta. Myös hiilihydraatti-typpi –suhde vaikuttaa erilaiseen eps-tuottoon. Eksopolysakkarideja tuottavien kantojen käyttö vaikuttaa myös tuotteen primääriseen rakenteeseen eli tuhtiuteen. [7]

Mediumin koostumus vaikuttaa oleellisesti eps-tuottoon. Hiilihydraatin lähde mediumissa on tärkeä, kun etsitään eksopolysakkarideja tuottavia kantoja. Sokereiden läsnäolo ja saatavuus vaikuttavat eps-tuottoon. Eri kannat vaativat kasvaakseen myös eri sokereita, esimerkiksi *L. lactis* ssp. *cremoris* tuottaa eksopolysakkaridia paremmin glukoosin kuin fruktoosin kanssa. [6]

Myös monet bakteerit, hiivat ja sienet voivat tuottaa polysakkarideja. Ne ovat rakenteeltaan huokoisia, kovalenttisilla sidoksilla yhdistyneitä ja esiintyvät solun pinnalla kudosmaisena tai limamaisena soluympäristössä. [3]

3.2 Eksopolysakkaridien tuottamat ominaisuudet

Viskositeetti, leikkausohentuminen ja elastisuus ovat tärkeitä ruoan ominaisuuksia. Viskositeetti vaikuttaa sakeuteen ja tuotteen ominaisuutena muodon pysyvyyteen. Fermentoitujen maitotuotteiden yhteydessä tämä voidaan kuvata limamaisena ja juoksevana. Reologisena ominaisuutena leikkausohentuminen on myös yhteydessä rakenteeseen esim. partikkeleiden sedimentoinnin estäjänä. Elastisuus taas on ominaisuus, jolla saadaan rakenteeseen pysyvyyttä ja ”kumimaisuutta” fermentoiduissa tuotteissa. Nämä ominaisuudet ovat tärkeitä aistinvaraisesti arvioitaessa tuotteen laatua, ulkomuotoa ja miellyttävää tunnetta suussa.[3]

Kaikki eksopolysakkarideja tuottavat maitohappobakteerit eivät tuota venyvyyttä, vaikka limaa tai limamaisuutta tuottaisivatkin. Jotkut taas voivat tuottaa useampaakin ominaisuutta, riippuen viljelyalustan koostumuksesta. Venyvyyden tuotto on geneettisesti epävakaa ja viljelyissä saatetaan useiden testien kautta havaita venymätöntä kantaa. [6]

Polysakkaridit voivat olla ruoassa lisäaineena tai ne voidaan tuottaa ruoassa *in situ*, näin osallistuen valmistusprosessiin raaka-aineena. Useimmissa tapauksissa koostumus ja rakenne lopputuotteessa on tulos raaka-aineiden yhteisvaikutuksesta, esimerkiksi maidon proteiinit ovat edellytyksenä polysakkaridien toiminnalle. [3]

Lactococcus lactis on gram-positiivinen maitohappobakteeri, jota käytetään maidon hapattamiseen useissa teollisuuden maitotuotteissa. Useimmat kannat sisältävät plasmidin, joka vaikuttaa laktoosin käyttöön, faagiresistanssiin, proteinaasiaktiivisuuteen ja eksopolysakkaridien tuottoon.[8] Tuottoa tutkittaessa on saatu tuloksia käyttämällä hybridisaatiossa *epsB* ja *epsD* geenejä, joiden on todettu olevan hyvin konservoituneita.

3.3 Eksopolysakkaridien vaikutukset

Kun eksopolysakkarideja tuotetaan *in situ*, ne voivat toimia luonnollisina sakeuttajina antaen tuotteelle tarkoituksenmukaisen koostumuksen. Joillakin eksopolysakkarideilla voi olla terveyttä edistäviä vaikutuksia ja tämän vuoksi ne ovat entistä kiinnostavampia ja niiden ominaisuuksia halutaan tuntea entistä enemmän. Geneettisesti muokattujen organismien, jotka tuottavat korkeita pitoisuuksia eksopolysakkarideja, käyttö on rajallista. Tämä johtaa entistä enemmän etsimään luonnollisia, hyviä eksopolysakkarideja tuottavia kantoja. [6]

Maitohappobakteereilla on GRAS (Generally Recognised As Safe) –status, ja siksi niiden tuottamat eksopolysakkaridit, joilla on rakennetta muokkaavia ominaisuuksia, tekevät niistä kiinnostavia ruokateollisuudelle. Laktokokkien lisäksi esimerkiksi propionibakteerien ja bifidobakteerien tiedetään tuottavan eksopolysakkarideja. [3]

4 Käytetyt menetelmät ja kannat

Työssä käytettiin edellisten töiden pohjalta valittuja viilihapatekantoja, jotka oli todettu hyviksi tai potentiaalisiksi viilin haluttujen ominaisuuksien aikaansaamiseksi. Näistä kannoista on valittu neljään eri seokseen toisiaan tukevia mikrobikantoja, jotka toimivat hyvin yhdessä ja saivat aikaan viiliin mahdollisimman suotuisan koostumuksen.

VK mikrobit, eli viilihapatteen *Leuconostoc* arominmuodostajamikrobit, kasvatettiin MRS-alustassa, EVK, eli *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* ja EK haponmuodostajamikrobit *L. lactis* ssp. *lactis* ja *L. lactis* ssp. *cremoris* M17 alustassa johon lisättiin 1 % laktoosia (liite 1). Mikrobien kasvatus kesti normaalisti yön yli, jonka jälkeen niistä tehtiin joko nuorennokset tai lisättiin kasvatusalustassaan olevien solujen joukkoon glyserolia 15 %, jäädytettiin nestetypessä ja säilytettiin -70 ºC pakkasessa.

Kasvatetuista mikrobeista tehtiin neljä seosta 3, 5, 7 ja 16. Näitä neljää seosta ja niiden ominaisuuksia tutkittiin työssä maitokasvatuksilla.

4.1 Eksopolysakkaridien tuoton tutkiminen

4.1.1 PCR

Polymeraasiketjureaktiolla monistettiin DNA-fragmentit, joita käytettiin hybridisaatiotyössä koettimina. Työhön valittiin positiiviseksi controlliksi *cremoris A* – kanta (*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*), jonka tiedetään tuottavan eksopolysakkarideja. Negatiivisena kontrollina GRS5 (MG1614).

Eksopolysakkaridien tuottoa ohjaa useasta geenistä koostuva eps-klusteri. Klusterissa sijaitsevat geenit *epsB* ja *epsD* ovat hyvin konservoituneita ja niillä on homologisia geenejä tutkituissa eps-klustereissa gram-positiivisilla kokeilla. Alukkeet valittiin kirjallisuutta hyväksikäyttäen ja ne löytyvät taulukosta 2.

Taulukko 2. PCR-reaktiossa käytetyt alukkeet.

Aluke	**Pitoisuus (100 pmol/µl)**	**Sekvenssi (5'-3')**
epsBf	598	CGTACGATTCGTACGACCAT
epsBr	678	TGACCAGTGACACTTGAAGC
epsDf	607	TGATCCCCGTGTAACGAAGA
epsDr	576	AAGAGAGGCGCTCCCCATAT

f = forward (5'→3'), r = reverse (3'→5')

Solujen hajotus:

Yön yli kasvanut solumassa erotettiin kasvatusalustasta sentrifugoimalla putki 13000 rpm 3 minuutin ajan, poistettiin supernatantti. Solupelletti suspensoitiin 80 µl:aan steriiliä vettä ja lisättiin joukkoon lasihelmiä. Solut hajotettiin kuulamyllyllä 2 kertaa 45 sekunnin ajan. Joukkoon lisättiin 100 µl steriiliä vettä. Lasihelmet sentrifugoitiin putken pohjalle 13000 rpm 3 min. Lopuksi putkista otettiin supernatantti talteen jatkokäsittelyjä varten.

epsB ja epsD monistus:

epsB ja *epsD* –fragmentit monistettiin PCR:lla käyttäen *cremoris A* –kantaa templaattina.

Näyte- ja reagenssitilavuudet

1 µl	templaatti
8 µl	dNTP
5 µl	10 x Buffer
1 µl	aluke 1 (*epsB*/*epsD*)
1 µl	aluke 2 (*epsB*/*epsD*)
33,5 µl	H_2O
0,5 µl	Dynazyme
yht. 50 µl	

PCR-ohjelma:

95 ºC	2 min	alkudenaturaatio
25 sykliä:		
95 ºC	30 s	denaturaatio

58 ºC	1 min	alukkeiden kiinnittyminen
72 ºC	1 min	juosteiden syntetisointi

Lopetus:

72 ºC	7 min	loppusyntetisointi

PCR-tuotteet ajettiin agaroosigeelielektroforeesilla varmistaen PCR-monistuksen toimivuus ja tuotteiden koko.

PCR-näytteiden puhdistus:

Näytteet puhdistettiin käyttäen QIAquick PCR Purification kittiä.

Näytteiden joukkoon lisättiin 5-kertainen tilavuus puskuria PB. Sisältö siirrettiin kitin putkeen ja sentrifugoitiin 13000 rpm 60 s. Keräysputki tyhjennettiin ja putkeen jäänyt näyte pestiin 0,75 ml PE-puskurilla ja sentrifugoitiin 13000 rpm 1 min. Keräysputki tyhjennettiin ja toistettiin sentrifugointi. Näyte siirrettiin uuteen eppendorf-putkeen ja DNA eluoitiin pipetoimalla 30 µl steriiliä vettä QIAquick -membraanille ja sentrifugoitiin 13000 rpm 1 min.

Leimaus:

Cremoris A:n DNA:sta monistetut DNA-fragmentit epsB ja epsD leimattiin käyttäen Rochen DIG High Prime kittiä.

Puhdistettua tuotetta pipetoitiin 16 µl uuteen putkeen koettimen valmistukseen. DNA denaturoitiin kiehuvassa vesihauteessa 10 min ja jäähdytettiin nopeasti jäillä. DIG-High Prime sekoitettiin hyvin ja sitä lisättiin denaturoidun DNA:n joukkoon 4 µl ja inkuboitiin yön yli 37 ºC:ssa. Reaktio pysäytettiin inkuboimalla putkessa olevaa näytettä 10 minuuttia 65 ºC:ssa. Tämän jälkeen koetin pakastettiin.

4.1.2 Totaali-DNA-eristys

Tutkittavista kannoista tehtiin DNA-eristykset hybridisaatiota varten.

1 ml yli yön kasvaneita soluja jäähdytettiin jäillä ja sentifugoitiin eppendorf-putkien pohjalle 13000 rpm 3 min 4 ºC. Supernatantti pipetoitiin pois ja putkiin lisättiin

5 µl	0,5 M EDTA
10 µl	1 M Tris-HCl pH 7,5
10 µl	100 mg/ml lysotsyymi
0,5 µl	1 M $CaCl_2$
5 µl	1 M DTT
469,5 µl	H_2O
yht. 500 µl	

Solut inkuboitiin 1 h 37 ºC vesihauteessa, jonka jälkeen lisättiin

35 µl	10 % SDS
14 µl	25 mg/ml proteinaasi K
151 µl	H_2O
yht. 700 µl	

Inkubointi 30 min 37 ºC. Kun lysaatti oli kirkastunut, putkiin lisättiin 350 µl kloroformia ja 350 µl fenolia, sekoitettiin kunnolla ja sentrifugoitiin huoneenlämmössä 13000 rpm 15 min. Yläfaasi siirrettiin uuteen eppendorf-putkeen, johon lisättiin 700 µl kloroformi-isoamyylialkoholia, jota sentrifugoitiin 13000 rpm 15 min. Tästä pipetoitiin yläfaasi uuteen eppendorf-putkeen ja tehtiin etanolisaostus lisäämällä siihen

50 µl	3 M NaAc
950 µl	96 % EtOH

Sekoitettiin ja laitettiin - 20 ºC o/n.

Saostuksia sentrifugoitiin 13000 rpm 3 min, poistettiin neste ja lisättiin 200 µl 70 % etanolia. Sentrifugointi 13000 rmp 10 min, jonka jälkeen etanoli poistettiin ja pelletti kuivattiin vakuumisentrifuugissa 10 minuutin ajan. Pelletti liuotettiin 25 µl:aan steriiliin veteen.

DNA-eristyksistä mitattiin absorbanssit, jotta hybridisaatioon saataisiin verrattavissa olevat määrät DNA:ta. Mittaustulokset taulukossa 3.

Taulukko 3. DNA-eristysten absorbanssimittaukset.

kanta	**λ 260**	**λ 280**	**laimennos**	**saanto ug/ml**	**puhtaus**
creA	0,5765	0,5145	1/50	1441,25	1,121
GRS5	1,0935	0,5861	1/50	2733,75	1,866
C5EK	0,8804	0,475	1/50	2201	1,853
A9EK	1,0666	0,6691	1/50	2666,5	1,594
A2EK	0,7091	0,3673	1/80	2836,4	1,931
A12EK	0,692	0,3648	1/80	2768	1,897
C3EK	0,5668	0,3213	1/50	1417	1,764
C8EK	0,9877	0,5401	1/50	2469,25	1,829
C18EK	0,2699	0,1522	1/50	674,75	1,773
C19EK	1,0868	0,5977	1/50	2717	1,818
I-4EK	0,6547	0,3601	1/50	1636,75	1,818
I-13EK	0,5179	0,2969	1/50	1294,75	1,744
I-3EK	0,2346	0,1557	1/50	586,5	1,507

4.1.3 Totaali-RNA-eristys

Työssä lähdettiin tutkimaan eksopolysakkaridien tuottoa myös eristämällä RNA. Eristykset tehtiin käyttäen Promegan SV Total RNA Isolation System –kittiä.

Jäillä sulatetut solut suspensoitiin 1 ml:aan DEPC-vettä ja sentrifugoitiin putkien pohjalle 13000 rpm 3 min 4 ºC. Supernatantti poistettiin ja pelletti suspensoitiin 600 µl:aan lyysis-puskuria, johon lisättiin 4,2 µl β-merkaptoetanolia. Uusiin eppendorf-putkiin laitettiin 100 µl lasihelmiä, joiden päälle solususpensio pipetoitiin. Solut hajotettiin kuulamyllyssä 3 * 1 min jaksoissa. Supernatantti otettiin talteen ja siihen lisättiin 500 µl 70 % etanolia ja sekoitettiin.

Suspensio siirrettiin kitin keräystuubissa olevaan kolonniin. Sentrifugointi 13000 rpm 1 min, jonka jälkeen filtraatti poistettiin.

Kolonniin lisättiin 600 µl Low-salt –pesupuskuria ja sentrifugoitiin 13000 rpm 1 min. Filtraatti poistettiin ja toistettiin sentrifugointi 2 min. Sekoitettiin DNAasi puskuria ja DNAasi I:sta suhteessa 10:1, jota pipetoitiin 55 µl yhteen kolonniin. Inkubointi vesihauteessa 15 min 37 ºC.

Kolonniin lisättiin 600 µl High-salt –pesuliuosta ja sentrifugoitiin 13000 rpm 1 min ja poistettiin filtraatti. Tämän jälkeen lisättiin kahteen kertaan Low-salt –pesupuskuria, ensin 600 µl ja sitten 300 µl ja sentrifugoitiin.

Kolonni siirrettiin uuteen eppendorf-putkeen, johon lisättiin 100 µl eluutiopuskuria. Inkubointi 2 min huoneenlämmössä ja sentrifugointi 1 min. Eluointi tehtiin kahteen kertaan, eli RNA-preparaattia 200 µl, johon lisättiin 33 µl 3 M NaAc ja 700 µl 94 % EtOH. Saostettiin - 20 ºC o/n.

Putkia sentrifugoitiin 13000 rpm 4 ºC:ssa 20 minuutin ajan. Supernatantti poistettiin ja pelletti pestiin 70 % etanolilla ja sentrifugoitiin 13000 rmp 15 min. Etanoli poistettiin ja pelletti kuivattiin vakuumisentrifuugissa ja liuotettiin 25 µl:aan DEPC-veteen.

Eristetyistä RNA-näytteistä mitattiin absorbanssit hybridisaatioon käytettävää näytetilavuutta varten. Nämä mittaustulokset löytyvät taulukosta 4.

Taulukko 4. RNA-eristysten absorbanssimittaukset.

kanta	**λ 260**	**λ 280**	**laimennos**	**saanto ug/ul**	**puhtaus**
creA	0,2306	0,1382	1/50	0,4612	1,669
A2EK	0,5133	0,2985	1/50	1,0266	1,720
A12EK	0,3676	0,2229	1/50	0,7352	1,649
C3EK	0,2774	0,1723	1/50	0,5548	1,610
C8EK	0,2661	0,1561	1/50	0,5322	1,705
C18EK	0,2155	0,1079	1/50	0,431	1,997
C19EK	0,2651	0,1633	1/50	0,5302	1,623
I-3EK	0,3222	0,1883	1/50	0,6444	1,711
I-4EK	0,1964	0,1198	1/50	0,3928	1,639
I-13EK	0,2511	0,1525	1/50	0,5022	1,647
GRS5	0,3485	0,2217	1/50	0,697	1,572
C5EK	0,6804	0,3838	1/50	1,3608	1,773

4.1.4 Hybridisaatio

Hybridisaatioon valittujen kantojen solut hajoitettiin kohdan 4.1.1 mukaisesti.

Hybridisaatio:

Membraani huuhdeltiin 100 µl steriilillä vedellä ja pipetoitiin näytteet. Imu laitettiin päälle ja huuhdeltiin 100 µl steriilillä vedellä. Membraanin annettiin kuivua n. ½ tuntia, jonka jälkeen kiinnitys UV:lla. Membraani kostutettiin hybridisaatiopuskuriin ja laitettiin putkeen, jonne kaadettiin loput käytettävästä puskurista (yht. 20 ml). Esihybridisaatio suoritettiin 65 ºC:ssa 2 h. Tämän jälkeen puskurit kaadettiin pois ja putkeen lisättiin 10 ml puskuria, jossa 4 µl valmistettua koetinta. Hybridisaatio 68 ºC yön yli.

Detektio:

Membraani pestiin pesuliuoksessa huoneenlämmössä 2 * 5 minuutin ajan ja 68 ºC:een temperoidussa pesuliuoksessa 2 * 15 minuutin ajan. Membraani inkuboitiin 30 minuuttia puskuri 2:ssa ja 30 minuuttia puskuri 2:ssa, johon lisättiin 2 µl vasta-ainetta. Pesu tehtiin 2 * 15 min pesupuskurissa, jonka jälkeen membraani tasapainotettiin 3 min puskuri 3:ssa. Membraania inkuboitiin 5 min substraattiliuoksessa, jossa puskuri 3:seen liuotettiin 100 µl/10 ml CSPD:tä. Imupaperilla kuivattiin membraania hetki, jonka jälkeen se suljettiin hybridisaatiopussiin. Esi-inkubointi 37 ºC:ssa. Detektio kuvantamislaitteella useammalla valotusajalla.

4.1.5 RNA-näytteiden hybridisaatio

RNA:t sulatettiin hitaasti jäillä ja haluttuun näytemäärään pipetoitiin saman verran denaturaatioliuosta.

50 µl denaturaatioliuos:

17 µl	1 M de-ionisoitua glyoksaalia
12,5 µl	0,08 M Na-fosfaattipuskuria pH 6,5

20,5 µl H_2O (DEPC)

Näytteitä inkuboitiin 1 h 50 ºC.

Näytemääränä 3 µg RNA:ta.

Käytetyt laitteet ja välineet käsiteltiin DEPC-vedellä ja reagenssit valmistettiin DEPC-veteen.

Membraani kostutettiin DEPC-vedellä 5 minuutin ajan ja siirrettiin minifold dot-blot –laitteeseen. Kolot pestiin 100 µL:lla DEPC-vettä vakuumissa. Vakuumi-imu poistettiin ja pipetoitiin näytteet koloihin. Vakuumin avulla imeytettiin näytteet membraanille ja huuhdeltiin kolot vielä 100 µl:lla DEPC-vettä.

Membraanin annettiin kuivua suodatinpaperin päällä 20 min, jonka jälkeen se laitettiin vakuumiuuniin 120 ºC, 30 minuutin ajaksi, jolloin glyoksaali poistuu ja RNA kiinnittyy membraaniin.

Esihybridisaatio 68 ºC, hybridisaatio 68 ºC yön yli.

Detektio tehtiin kuten DNA-hybridisaatiossa.

4.2 Pulssikenttäelektroforeesi

PFGE:tä varten kasvatettiin hapateseoksiin 7 ja 16 valitut haponmuodostajamikrobit. Kasvatukset o/n 25 ºC M17 liuoksessa, jossa 1 % glysiiniä. Kokeessa käytetyt reagenssit ja liuokset löytyvät liitteestä 3.

Näytteistä mitattiin absorbanssi 600 nm aallonpituudella ja suspensioiden ollessa eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa OD_{600} = 0,6-0,9, lisättiin joukkoon 0,1 mg/ml kloramfenikolia ja jatkettiin kasvatusta 1 h.

Kasvatuksen jälkeen solut sentrifugoitiin putken pohjalle ja supernatantti poistettiin. Soluja pestiin 1,5 ml solususpensiopuskurilla ja sentrifugoitiin 11000 rpm 5 min. Pelletti suspensoitiin 110 µl:aan solususpensiopuskuria, jonka jälkeen temperointi 50 ºC:een. Samaan lämpötilaan temperoitua agaroosia pipetoitiin 110 µl putkiin ja valettiin näytemuotteihin. Näytteiden annettiin jähmettyä n. 15 min 4 ºC:ssa. Näyteblokit

siirrettiin 10 ml:n putkiin ja niiden päälle lisättiin 4 ml lyysipuskuria sekä 2,5 mg/ml lysotsyymia. Inkuboitiin yön yli 37 ºC.

Proteinaasi-K käsittely:

Lyysipuskuri poistettiin ja näyteblokit huuhdeltiin 2 kertaa steriilillä vedellä. Blokkien päälle pipetoitiin 4 ml proteinaasi K –puskuria ja 1 mg/ml proteinaasi K:ta. Inkuboitiin 50 ºC:ssa viikonlopun yli.

Pesu:

Proteinaasi K –puskuri poistettiin ja blokit huuhdeltiin steriilillä vedellä 2 kertaa. Putkiin lisättiin 5 ml pesupuskuria sekä 50 µl PMSF:ää, joka inaktivoi proteinaasi K:n. Putket siirrettiin ravistelijaan 145 rpm 1 tunniksi. Tämän jälkeen pesu toistettiin.

PMSF liuokset poistettiin ja tilalle pesupuskuria 5 ml. Ravisteluun 1 tunniksi. Tämä vaihe tehtiin kahteen kertaan.

Blokit laitettiin eppendorf-putkissa säilytykseen 4 ºC:een säilytysliuoksessa.

DNA:n pilkkominen restriktioentsyymillä:

Näyteblokit pestiin 0,1 x TE-puskurilla 1 h ja tasapainotettiin 700 µl 1 x –restriktiopuskurissa 1 h.

Restriktiopuskuri poistettiin ja tilalle laitettiin 1 x restriktiopuskuria ja pohjalle *Sma*I –entsyymiä 40 U/blokki. Reaktio o/n 30 ºC.

PFGE-ajo:

Restriktoidusta blokista laitettiin 1/3 tasapainottumaan 0,5 x TBE-puskuriin 1 tunniksi. Puoli tuntia ennen ajoa valettiin agaroosigeeli ja täytettiin PFGE-laite 2 l:lla TBE-puskuria ja lämpötila jäähdytettiin 14 ºC:een. Blokit ”liimattiin” agaroosigeelin kaivoihin.

Ajoparametrit:

Pulssiväli	1-26 s
Ajoaika	22 h
Kulma	120 º
Jännite	6 V / cm

Geelin värjäys:

Geeli värjättiin 0,5 x TBE-puskurilla, jossa 0,5 µg/ml etidiumbromidia 20 minuutin ajan. Geeli huuhdeltiin vedellä 10 minuutin ajan, jonka jälkeen se kuvattiin.

4.3 Maitokasvatukset

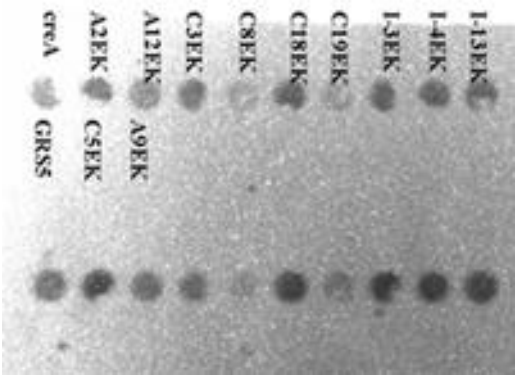
Maitokasvatuksissa käytettiin pastöroitua 1,5 % kevytmaitoa. Hapateseoksia 3, 5, 7 ja 16 pipetoitiin 6 % 150 ml:aan maitoa ja annettiin kasvaa yön yli 20 ºC:ssa. Kasvatuksista mitattiin pH ja viskositeetti, sekä aistinvaraisesti venyvyys ja saostavuus.

Mittaukset tehtiin 4 kertaa viikossa ja säilytettiin nuorennettuina jääkaappilämpötilassa viikonlopun yli. Kylmän säilytyslämpötilan vaikutus viilin rakenteen muodostumiseen testattiin rinnakkaisilla näytteillä, eikä sillä todettu olevan suurta vaikutusta kasvuun.

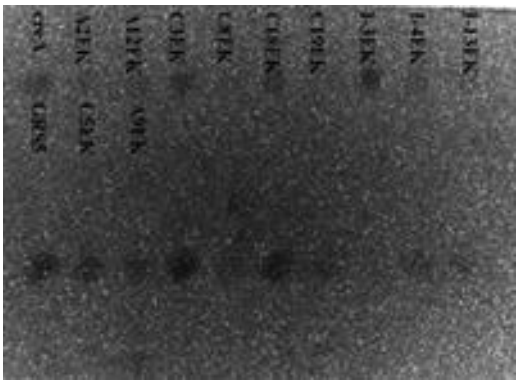
5 Tulokset

5.1 eps-tuotto

Hybridisaatiomenetelmä todettiin toimivaksi ja kantojen välillä huomattiin eroja. Tuloksista nähdään kantojen eksopolysakkaridin tuotto tiettyä DNA-määrää kohti. Hybridisaatiossa testattiin ensin 20 ng ja 50 ng määrä DNA:ta, jotka eivät näkyneet detektiossa. Tuloksia saatiin kuvien 1 ja 2 mukaisesti, joissa ylärivillä näkyy 1 µg ja alarivillä 2 µg DNA-määrällä saadut detektiot.



Kuva 1. DNA-hybridisaatio epsB –koettimella.



Kuva 2. DNA-hybridisaatio epsD –koettimella.

Tutkimukseen valittiin haponmuodostajia, joilla yksittäisten kantojen maitokasvatuksissa oli saatu sekä hyviä, että heikosti hapattavia tuloksia. Näitä verratessa tulokset täydentävät toisiaan.

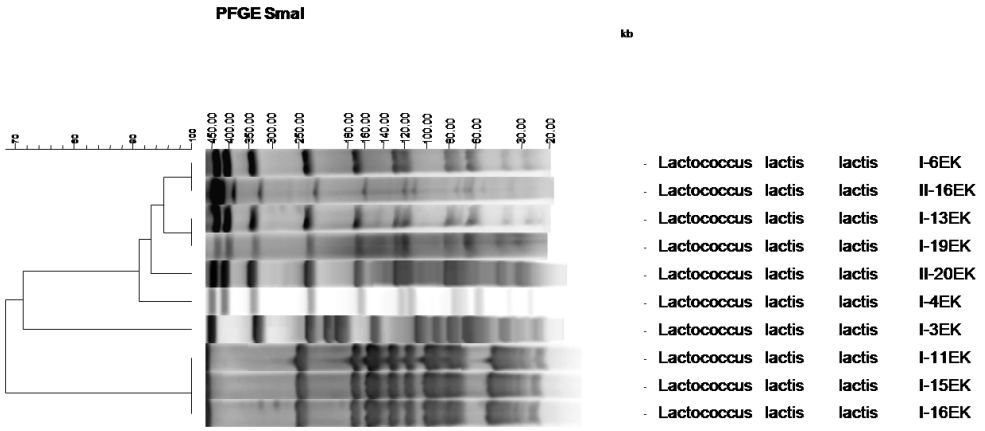
RNA-eristetyistä kannoista ei saatu hybridisaatiolla tuloksia, todennäköisesti RNA:t jäivät kiinnittymättä membraanille, joten eivät näkyneet detektiossa.

5.2 Pulssikenttäelektroforeesi

Pulssikenttäelektroforeesikokeilla saatiin täydennettyä hapatteissa käytettävien maitohappobakteerikantojen genotyyppejä.

Tässä työssä kannat digestoitiin entsyymillä *Sma*I, joka oli todettu hyväksi sekä laktokokkien että leukonostokien digestointiin. Kantojen DNA-profiilit analysoitiin Bionumerics^{TM}-ohjelmalla (Applied Maths) UPGMA-menetelmällä. Tuloksena saadusta

dendrogrammista voidaan havaita, että osalla kannoista on keskinäistä samankaltaisuutta, osa profiileista on identtisiä (kuva 3). Toisaalta dendrogrammissa on havaittavissa eroja kantojen välillä. Jos raja-arvoksi otetaan 80 % samankaltaisuus, kannat voidaan jakaa kolmeen eri ryhmään profiilien perusteella.



Kuva 3. Hapatekantojen DNA-profiilit.

5.3 Maitokasvatukset

Maitokasvatukset tehtiin kahdessa osassa; ensin pitkä 6 viikon maitokasvatus, josta näkyy seosten pysyvyys pitkällä aikavälillä ja sitten lyhyempi 2 viikon maitokasvatus, jossa testattiin kylmässä seisottamisen vaikutusta hapateseoksiin.

Hapateseoksista tutkittiin niiden hapatusominaisuuksia aistinvaraisesti; maidon saostamista ja venyvyyden tuottoa, sekä mitattiin pH ja viskositeetti.

5.3.1 Kuuden viikon maitokasvatukset

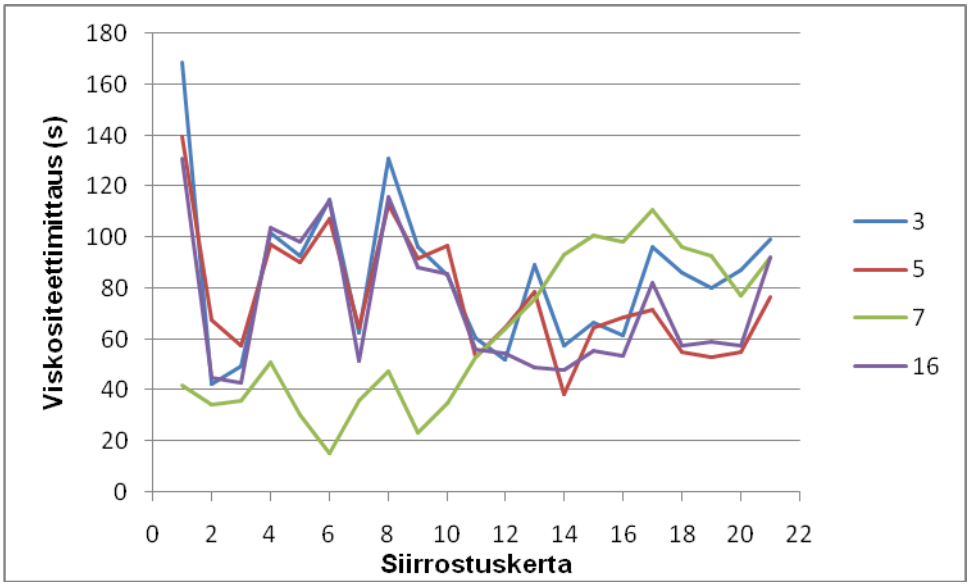
Aluksi kasvatuksissa oli mukana rinnakkaiset vertailut jokaisesta seoksesta. Toisella viikolla näistä valittiin ominaisuuksiltaan paremmat, joiden kasvatusta jatkettiin seuraavien viikkojen ajan. 4. viikon lopulla tehtiin rinnakkaiset nuorennokset, joista toiset laitettiin +4 ºC:een viikon ajaksi ja verrattiin tuloksia viikolla 6. Seoksiin 5 ja 7 kylmässä seisottamisella oli nähtävästi positiivinen vaikutus ja seoksilla 3 ja 16 kylmällä

ei ollut oleellista merkitystä tuloksiin. Kuuden viikon maitokasvatusten tulokset löytyvät liitteestä 6, taulukoista 1-4.

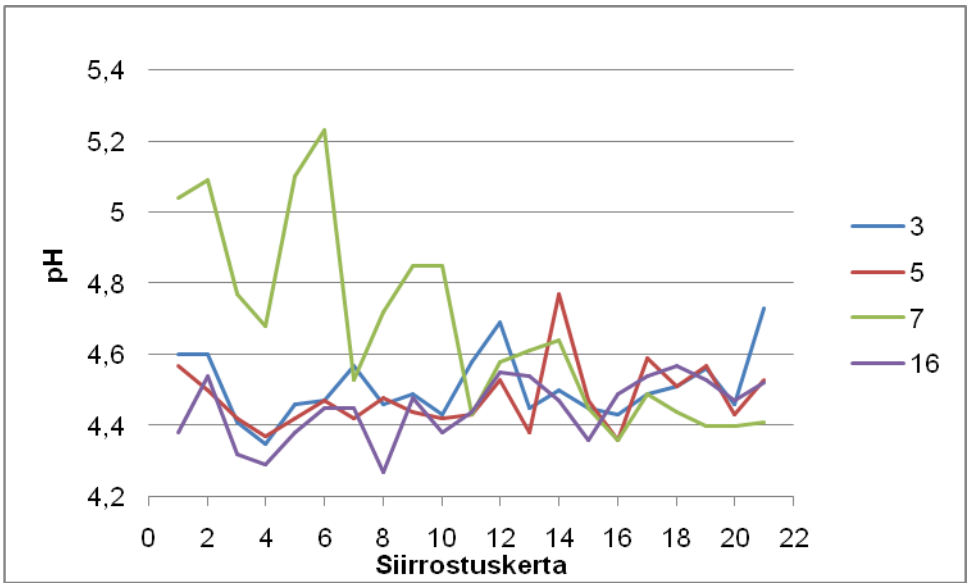
Jokaisella viikolla hapatteilla oli tietynlainen rytmi. Kaikki hapatteet vaativat tietyn heräämisajan kylmäkäsittelyn jälkeen ja viikon puolessa välissä saatiin parhaat, viilimäistä rakennetta vastaavat tulokset. Tämän perusteella kylmästä herätyksen jälkeen hapatteet vaatisivat 1-2 nuorennosta, jonka jälkeen tuottavat parhaimmat ominaisuudet viilille.

Tulosten perusteella kolme seoksista ovat hyvin samankaltaisia keskenään ja käyttäytyvät viikon eri vaiheissa samalla tavalla. Seos 7 selkeästi eroaa muista ja näytti heränneen vasta testin loppuvaiheilla, jolloin sekä pH laski, että viskoosisuus nousi. Pysyvimmät ja tasaisimmat tulokset oli seoksella 16.

Kuvioista 1 ja 2 nähdään viskositeetti- ja pH-mittausten tulokset graafisena. Kuvioista näkee selkeämmin hapateseosten välisen eron ja niiden käyttäytymisvaihtelut viikon eri päivinä.



Kuvio 1. Viskositeettimittaukset.

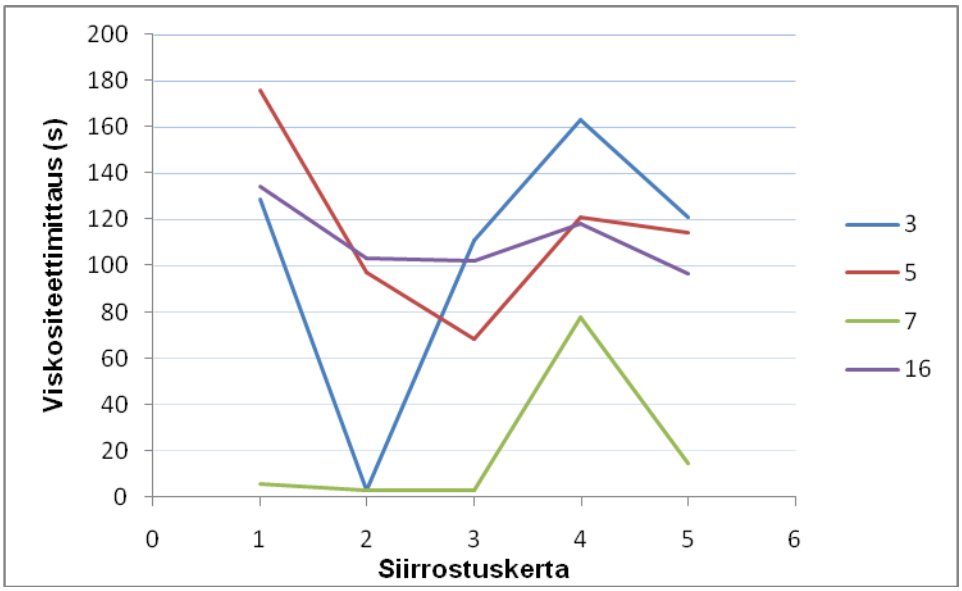


Kuvio 2. pH mittaukset.

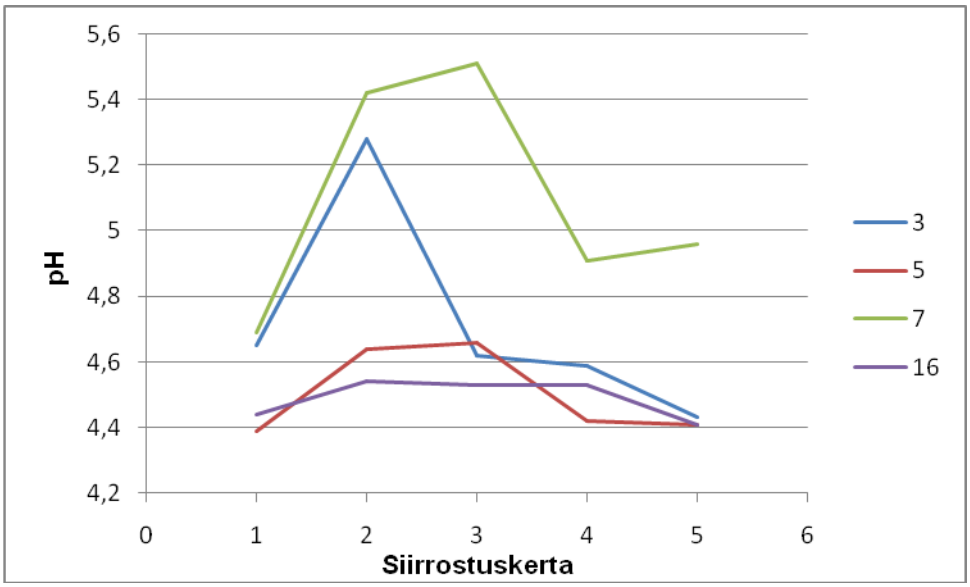
5.3.2 Kahden viikon maitokasvatukset

Kuvioista 3 ja 4 voidaan helposti nähdä hapatteiden tietynlainen viikkorytmi ja ”herääminen” kylmässä säilytyksen jälkeen. Myös pH:n vaikutus viskositeettiin on selkeä.

Kasvatuksissa verrattiin lisäksi kylmän vaikutusta nuorentamattomaan seokseen. Tulokset näkyvät liitteen 6 taulukossa 5 harmaina ja ovat verrannollisia I viikon ensimmäisiin tuloksiin. Seoksilla 3 ja 16 näkyy lievää ominaisuuksien laskua, kun taas seokset 5 ja 7 ovat muuttuneet kylmässä parempaan suuntaan.



Kuvio 3. Viskositeettimittaukset, maitokasvatus 2.



Kuvio 4. pH mittaukset, maitokasvatus 2.

6 Yhteenveto

Eksopolysakkaridien tuoton tutkiminen hybridisaatio-menetelmällä DNA-tasolla todettiin toimivaksi ja erot kantojen välillä nähtiin selkeästi. Hybridisaatioon valitut alukkeet toimivat ja pystyttiin havaitsemaan eksopolysakkaridia tuottavat hapatekannat. Tässä työssä saadut tulokset täydentävät yksittäisten kantojen saostus- ja venyvyystuloksia, mutta todettiin myös huonosti maitoa saostavien kantojen tuottavan jossain määrin eksopolysakkarideja. RNA-hybridisaatiosta ei onnistuttu saamaan tuloksia.

Maitokasvatusten tuloksista havaitaan hapatekantojen käyttäytyminen ja ominaisuuksien ilmentäminen seoksissa, sekä siirrostuskertojen ja kylmän vaikutus hapatteiden toimivuuteen ja aktiivisuuteen. Selkeitä eroja hapateseosten väliltä löytyy ja tulosten perusteella pystytään kohdistamaan hapateseosten käyttö erilaisten lopputuotteiden valmistukseen. Nämä kokeet osoittavat myös hapateseoksen koostamisen vaikeuden ja tarpeen testata erilaisia seoksia olosuhteissa, jotka vaikuttavat tuotteiden valmistusprosesseissa.

LÄHTEET

[1] Varnam, A. & Sutherland, J. 1994. Milk and milk products. London: Chapman & Hall.

[2] Jönsson, U. & Bertelsen E. 1982. Från Mjölk till Mejeriprodukter: K-Mjölkprodukter. Livmedelsbranchernas yrkesnämnd, Brevskolan. Suom. Kauppi, V. 1989. Maidosta meijerituotteiksi: Kulutusmaitotuotteet. Helsinki: Valtion painatuskeskus.

[3] McKenna, B. M. & Kilcast, D. 2003. Texture in Food, Volume 1: Semi-solid Foods. Cambridge: Woodhead Publishing.

[4] Leporanta, K. & al. 1989. Hapatekirja, Meijerihapatteiden valmistuksen käsikirja, Helsinki: Valio.

[5] Jönsson, U. & Bertelsen E. 1982. Från Mjölk till Mejeriprodukter: Syrning. Livmedelsbranchernas yrkesnämnd, Brevskolan. Suom. Kauppi, V. 1989. Maidosta meijerituotteiksi: Kulutusmaitotuotteet. Helsinki: Valtion painatuskeskus.

[6] Ruas-Madiedo, P. & de los Reyes-Gavilán, C. G. 2005. Invited Review: Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria.

[7] Ruas-Madiedo, P. & al 2004. Effect of exopolysaccharides and proteolytic activity of Lactococcus Lactis subsp. cremoris strains on the viscosity and structure of fermented milks.

[8] Deveau, H. & Moineau, S. 2003. Technical Note: Use of RFLP to Characterize Lactococcus Lactis Strains Producing Exopolysaccharides.

[9] Van Kranenburg, R. & al. 1999. Functional Analysis of Glycosyltransferase Genes from Lactococcus Lactis and Other Gram-Positive Cocci: Complementation, Expression, and Diversity.

M17-alusta (Merck):

5 g	tryptoni
5 g	kasitoni/polypeptoni
5 g	soijapeptoni
5 g	lihauute
2,5 g	hiivauute
0,5 g	askorbiinihappo
0,25 g	magnesiumsulfaatti
19 g	dinatrium β-glyserofosfaatti

pH 6,9 ± 0,2

Sterilointi 120 ºC/ 20 min

10 % laktoosiliuos valmistetaan erikseen MQ-veteen, steriilisuodatetaan ja lisätään steriloituun alustaan 50 ml/l.

MRS-alusta (DIFCO):

10 g	peptoni
10 g	lihauute
5 g	hiivauute
20 g	dextroosi
80 g	polysorbaatti
2 g	ammoniumsitraatti
5 g	natriumasetaatti
5 g	magnesiumsulfaatti
0,1 g	mangaanisulfaatti
2 g	dikaliumfosfaatti

pH 6,5 ± 0,2

Sterilointi 120 ºC/ 20 min

N-Lauroylsarkosine 10 %

SDS 10 %

20 x SSC:	NaCl 3 mol/l	58,44 g/mol	175,32 g/l
	Na-citrate 0,3 mol/l	294,10 g/mol	88,23 g/l
	pH 7,0		

Blocking stock : blocking reagent 10 %, liuotus Puskuri I

10 g/ 100 ml

lämmitetään hellävaraisesti, kunnes liuennut

Autoklavointi ja säilytys + 4 ºC

Puskuri I :	Maleiinihappo 0,1 mol/l	11,6 g
	NaCl 0,15 mol/l	30 ml 5 M (8,766 g)
	pH 7,5	
	Autoklavointi	

Pesupuskuri :	Puskuri I + Tween 20 0,3 %	200 ml + 600 µl
		300 ml + 900 µl
		500 ml + 1,5 ml

Puskuri II : Blocking stock 1 % Puskuri I

1 : 10

30 ml : 270 ml

Puskuri III :	Tris-HCl 0,1 mol/l	100 ml 1 M (pH 9,5)
	NaCl 0,1 mol/l	
	$MgCl_2$ 50 mmol/l	
	pH 9,5	

Lumigen CSPD stock : 10 mg/ml 23,5 mmol/l

Liuotetaan juuri ennen käyttöä 1 : 100 Puskuri 3:een.

0,235 mmol/l

Liuosta voidaan säilyttää + 4 ºC valolta suojattuna uudelleenkäyttöön (5 x).

Hybridisaatiopuskuri :	5 x SSC	50 ml 20 x	12,5ml
	Blocking reagent 1 %	20 ml 10 %	5 ml
	N-lauroylsarcosine 0,1 %	2 ml 10 %	0,5 ml
	SDS 0,02 %	200 µl 20 %	50 µl
	H_2O	128 ml	32 ml
		200 ml	50 ml

High SDS –puskuri :	7 % SDS	70 ml 20 %
	5 x SSC	50 ml 20 x
	1 % Blocking reagent	20 ml 10 %
	50 mM Na-fosf. pH 7,0	10 ml 1 M
	N-lauroylsarcosine 0,1 %	20 ml 20 %
	H_2O	30 ml
		200 ml

Hybridisaatiopesut :	2 x SSC, SDS 0,1 %	50 ml 20 x SSC
		2,5 ml 20 % SDS
		447,5 ml H_2O
		500 ml
	0,1 x SSC, SDS 0,1 %	2,5 ml 20 x SSC
		2,5 ml 20 % SDS
		495 ml H_2O
		500 ml

Solususpensiopuskuri :	100 ml, pH 7,2	
	10 mM Tris	0,121 g
	20 mM NaCl	0,117 g
	50 mM EDTA	1,861 g
Lyysipuskuri :	100 ml, pH 7,6	
	6 mM Tris	0,073 g
	1 M NaCl	5,844 g
	100 mM EDTA	1,861 g
	1 % Na-Lauroylsarcosine	1,000 g
	0,2 % Na-deoksikolaatti	0,200 g
Proteinaasi K –puskuri :	100 ml, pH 8,0	
	100 mM EDTA	3,722 g
	1 % Na-Lauroylsarcosine	1,000 g
	0,2 % Na-deoksikolaatti	0,200 g
Pesupuskuri :	100 ml, pH 8,0	
	20 mM Tris	0,242 g
	50 mM EDTA	1,861 g

PMSF (fenyylimetyylisulfonyylifluoridi, Sigma, P, 7626):

	100 mM	1,742 g
	94 % EtOH	100 ml
Säilytysliuos :	100 ml, pH 8,0	
	0,5 M EDTA	18,61 g
	1 % Na-Lauroylsarcosine	1,000 g

TE-puskuri :	100 ml, pH 8,0	
	10 mM Tris	0,121 g
	1 mM EDTA	0,037 g

10 x TBE-puskuri :	100 ml, pH 8,0	
	890 mM Tris-Base	108,0 g
	890 mM Boorihappo	55,00 g
	25 mM EDTA	9,300 g

Taulukko 1. Kuuden viikon maitokasvatukset. Hapateseos 3.

				pH	Viskositeettimitt. (s)			ka (s)	
vko I	B	+	*						päältä saostunut, maitomainen alta
		+	*		238	139	129	**169**	löysä, kokkareinen
		+	**	**4,6**	46	41	40	**42**	löysä, tasainen
	A	+	*						päältä saostunut, maitomainen osa
		+	***	**4,6**	102	85	77	**88**	tasainen, melko löysä
		+	*	**4,69**	40	41	41	**41**	löysä, tasainen
vko II	B	+	**	**4,41**	57	47	44	**49**	melko löysä, kokkareinen
		+	****	**4,35**	103	101	101	**102**	tuhti
		+	**	**4,46**	109	102	67	**93**	tuhti
		+	**	**4,47**	127	110	107	**115**	tuhti
	A	+	*	**4,42**	48	53	46	**49**	melko löysä
vko III		+	*	**4,57**	77	56	55	**63**	melko tuhti, kokkareinen
		+	****	**4,46**	155	117	120	**131**	hyvin tuhti, tasainen
		+	***	**4,49**	108	96	85	**96**	hyvin tuhti
		+	***	**4,43**	102	81	73	**85**	tuhti
vko IV		+	**	**4,58**	61	63	57	**60**	melko tuhti, kokkareinen
		+	****	**4,69**	51	52	53	**52**	melko tuhti
		+	****	**4,45**	102	86	79	**89**	tuhti, tasainen
		+	**	**4,5**	67	55	51	**58**	melko tuhti
vko V		+	**	**4,45**	76	64	59	**66**	melko tuhti
		+	**	**4,43**	62	65	57	**61**	melko tuhti
		+	***	**4,49**	112	93	84	**96**	tuhti
		+	***	**4,51**	97	78	83	**86**	tuhti
vko VI		+	**	**4,56**	102	65	73	**80**	tuhti
		+	***	**4,46**	77	86	98	**87**	tuhti
		+	***	**4,73**	101	102	94	**99**	tuhti
		Kylmässä viikon seisseet							
		+	**	**4,53**	62	73	73	**69**	tuhti
		+	**	**4,52**	79	77	75	**77**	melko tuhti, löystyvä

*Saostavuus (+/-), venyvyys (- = ei venyvyyttä, * = venyvä asteikolla 1-5).*

Taulukko 2. Kuuden viikon maitokasvatukset. Hapateseos 5.

				pH	Viskositeettimitt. (s)			ka (s)	
vko I	A	+	****						tuhti, hieman rakeinen
		+	*****	**4,57**	171	126	122	**140**	tuhti, tasainen
		+	**	**4,5**	81	59	63	**68**	löysä(hkö), tasainen
	B	+	****						tuhti
		+	****		282	204	187	**224**	tuhti, hieman kokkareinen
		+	****	**4,45**	112	64	80	**85**	tuhti
vko II	A	+	**	**4,42**	63	53	56	**57**	tuhti, kokkareinen
		+	***	**4,37**	128	79	85	**97**	tuhti
		+	***	**4,42**	106	82	83	**90**	tuhti
		+	***	**4,47**	122	100	100	**107**	tuhti
	B	+	***	**4,44**	44	36	35	**38**	melko tuhti, kokkareinen
vko III		+	**	**4,42**	76	60	58	**65**	tuhti, tasainen
		+	***	**4,48**	123	113	103	**113**	tuhti, tasainen
		+	***	**4,44**	102	91	82	**92**	tuhti
		+	****	**4,42**	112	91	87	**97**	tuhti
vko IV		+	*	**4,43**	58	51	49	**53**	melko tuhti, kokkareinen
		+	***	**4,53**	77	59	57	**64**	tuhti
		+	**	**4,38**	86	78	71	**78**	tuhti, tasainen
		+	**	**4,77**	38	39	38	**38**	melko löysä
vko V		+	***	**4,47**	74	60	59	**64**	melko tuhti, löystyvä
		+	***	**4,36**	69	69	68	**69**	tuhti
		+	**	**4,59**	85	69	61	**72**	tuhti
		+	**	**4,51**	50	56	59	**55**	tuhti
vko VI		+	**	**4,57**	34	60	65	**53**	tuhti, saostuu sekoitettaessa, kokk.
		+	**	**4,43**	52	54	59	**55**	melko tuhti
		+	**	**4,53**	78	77	74	**76**	tuhti, löystyvä
		Kylmässä viikon seisseet							
		+	***	**4,47**	86	87	88	**87**	tuhti
		+	***	**4,5**	68	85	89	**81**	tuhti, hyvin viilimäinen

*Saostavuus (+/-), venyvyys (- = ei venyvyyttä, * = venyvä asteikolla 1-5).*

Taulukko 3. Kuuden viikon maitokasvatukset. Hapateseos 7.

				pH	Viskositeettimitt. (s)			ka (s)	
vko I	A	+	**						osittain saostunut, maitomainen
		+	***	**5,04**	43	45	38	**42**	löysä, tasainen
		+	**	**5,09**	39	33	31	**34**	löysä
	B	+	***						melko tuhti
		+	*		105	100	94	**100**	löysä, kokkareinen
		+	-	**5,2**	4	4	4	**4**	löysä, maitomainen
vko II	A	+	*	**4,77**	50	29	29	**36**	melko löysä
		+	*	**4,68**	77	33	43	**51**	melko tuhti, löystyy sekoitettaessa
		+	*	**5,1**	35	28	28	**30**	melkö löysä
		+	*	**5,23**	15	12	18	**15**	löysä
	B	+	*	**4,83**	34	27	20	**27**	löysä
vko III		+	-	**4,53**	44	29	34	**36**	löysä, kokkareinen
		+	*	**4,72**	58	46	38	**47**	melko tuhti, löystyvä, kokkareinen
		+	*	**4,85**	22	24	23	**23**	löysä, kokkareinen
		+	**	**4,85**	42	33	30	**35**	melko löysä, kokkareinen
vko IV		+	*	**4,43**	61	50	48	**53**	melko löysä, kokkareinen
		+	***	**4,58**	73	62	57	**64**	tuhti, kokkareinen
		+	***	**4,61**	85	72	69	**75**	tuhti, tasainen
		+	****	**4,64**	102	90	87	**93**	tuhti
vko V		+	****	**4,45**	113	97	92	**101**	tuhti
		+	***	**4,36**	104	95	95	**98**	tuhti
		+	****	**4,49**	125	110	97	**111**	tuhti
		+	***	**4,44**	99	97	92	**96**	hyvin tuhti
vko VI		+	***	**4,4**	68	103	107	**93**	tuhti, kokk.
		+	*	**4,4**	63	79	89	**77**	tuhti
		+	***	**4,41**	98	92	86	**92**	tuhti, löystyvä
		Kylmässä viikon seisseet							
		+	****	**4,46**	99	108	121	**109**	tuhti
		+	***	**4,47**	117	113	114	**115**	tuhti, hyvin viilimäinen

*Saostavuus (+/-), venyvyys (- = ei venyvyyttä, * = venyvä asteikolla 1-5).*

Taulukko 4. Kuuden viikon maitokasvatukset. Hapateseos 16.

				pH	Viskositeettimitt. (s)			ka (s)	
vko I	A	+	***						melko tuhti, hieman kokkareinen
		+	****		159	121	112	**131**	melko tuhti, tasainen
		+	**	**4,54**	41	41	52	**45**	tuhti, kokkareinen
	B	+	****						melko tuhti
		+	****	**4,38**	131	116	114	**120**	tuhti, tasainen
		+	**	**4,43**	91	55	65	**70**	tuht, kokkareinen
vko II	A	+	*	**4,32**	49	42	38	**43**	melko tuhti
		+	*****	**4,29**	129	85	97	**104**	tuhti
		+	****	**4,38**	103	101	90	**98**	tuhti
		+	***	**4,45**	126	108	109	**114**	tuhti
	B	+	*	**4,33**	50	37	33	**40**	melko tuhti, kokkareinen
vko III		+	*	**4,45**	52	53	49	**51**	melko tuhti, tasainen
		+	*****	**4,27**	137	95	116	**116**	tuhti, tasainen
		+	***	**4,48**	95	89	81	**88**	tuhti
		+	***	**4,38**	96	85	76	**86**	melko tuhti
vko IV		+	*	**4,44**	62	56	50	**56**	melko tuhti, kokkareinen
		+	**	**4,55**	57	53	53	**54**	melko tuhti
		+	*	**4,54**	58	47	42	**49**	melko tuhti
		+	*	**4,47**	54	47	42	**48**	melko tuhti
vko V		+	*	**4,36**	59	55	52	**55**	melko tuhti
		+	*	**4,49**	61	49	50	**53**	melko löysä
		+	**	**4,54**	100	78	69	**82**	tuhti, kokk.
		+	**	**4,57**	54	56	62	**57**	tuhti, kokk., rakeinen
vko VI		+	**	**4,53**	46	62	69	**59**	melko tuhti
		+	**	**4,47**	41	64	67	**57**	tuhti
		+	**	**4,52**	94	97	85	**92**	tuhti
		Kylmässä viikon seisseet							
		+	**	**4,47**	63	70	67	**67**	tuhti
		+	**	**4,45**	66	67	62	**65**	tuhti, löystyvä

*Saostavuus (+/-), venyvyys (- = ei venyvyyttä, * = venyvä asteikolla 1-5).*

Taulukko 5. Kahden viikon maitokasvatukset.

		pH	Viskositeettimitt. (s)			ka (s)	
seos 3							
vko I	****	**4,57**	135	122	130	**129**	tuhti
	-	**5,28**	3	3	2	**3**	löysä
	4 asteessa o/n ollut maitokasvatus						
	**	**4,65**	142	85	112	**113**	tuhti, rakeinen
vko II	***	**4,62**	127	104	102	**111**	tuhti, herainen, tasoittuu sekoitettaessa
	***	**4,59**	192	157	140	**163**	tuhti, tasainen
	***	**4,43**	130	118	115	**121**	tuhti, tasainen
	6 vrk 4 asteessa seisseet kasvatukset						
	***	**4,32**	77	79	84	**80**	melko löysä, tasainen
	*****	**4,44**	210	178	170	**186**	hyvin tuhti, tasainen
seos 5							
vko I	***	**4,46**	226	150	151	**176**	hyvin tuhti
	***	**4,64**	121	87	83	**97**	tuhti
	4 asteessa o/n ollut maitokasvatus						
	***	**4,39**	370	277	238	**295**	hyvin tuhti
vko II	***	**4,66**	73	67	65	**68**	tuhti, herainen
	**	**4,42**	129	117	117	**121**	tuhti, tasainen
	***	**4,41**	116	115	112	**114**	tuhti, tasainen
	6 vrk 4 asteessa seisseet kasvatukset						
	***	**4,25**	173	158	159	**163**	melko tuhti, tasainen
	*****	**4,43**	224	213	209	**215**	hyvin tuhti, tasainen
seos 7							
vko I	-	**5,08**	5	6	6	**6**	löysä
	-	**5,42**	3	3	3	**3**	löysä
	4 asteessa o/n ollut maitokasvatus						
	*	**4,69**	119	89	104	**104**	melko löysä
vko II	****	**5,51**	3	3	3	**3**	löysä
	**	**4,91**	96	68	70	**78**	melko tuhti, herainen
	**	**4,96**	35	4	4	**14**	melko tuhti, tasainen
	6 vrk 4 asteessa seisseet kasvatukset						
	**	**4,44**	59	45	61	**55**	melko löysä, tasainen
	**	**4,86**	33	43	41	**39**	melko tuhti, tasainen

(jatkuu)

Taulukko 5 (jatkuu).

seos 16

vko I	****	**4,5**	151	124	128	**134**	hyvin tuhti
	**	**4,54**	108	102	99	**103**	tuhti
	4 asteessa o/n ollut maitokasvatus						
	***	**4,44**	79	97	107	**94**	melko tuhti
vko II	****	**4,53**	114	98	95	**102**	tuhti, tasainen
	****	**4,53**	121	115	119	**118**	tuhti, herainen, tasoittuu sekoitettaessa
	***	**4,41**	100	94	96	**97**	tuhti, tasainen
	6 vrk 4 asteessa seisseet kasvatukset						
	****	**4,27**	133	122	123	**126**	melko tuhti, tasainen
	****	**4,57**	131	154	159	**148**	tuhti,tasainen

*Saostavuus (+/-), venyvyys (- = ei venyvyyttä, * = venyvä asteikolla 1-5).*